



REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
Ministério da Indústria, do Comércio e do Turismo
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(51) Int. Cl.⁶:
A61K 35/78

(11) (21) **PI 9400120-0 A**

(22) Data de Depósito: 17/01/94

(43) Data de Publicação: 26/09/95 (RPI 1295)



(54) Título: Processo de obtenção de sumos e extratos de espécies de *Kalanchoe*; aplicação do sumo, extratos e seus componentes para imunossupressão e para o tratamento da leishmaniose

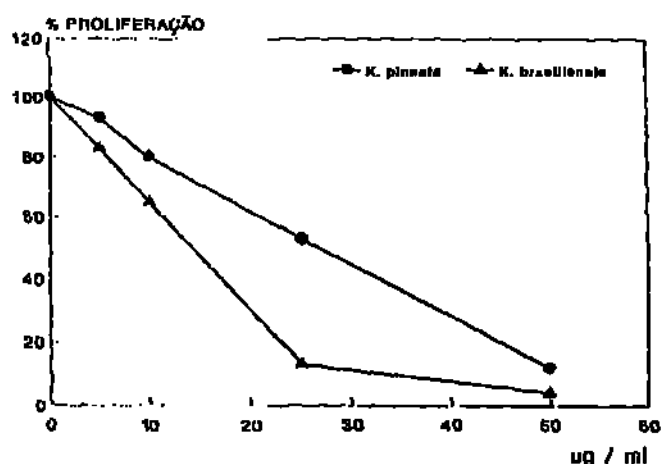
(71) Depositante(s): Universidade Federal do Rio de Janeiro (BR/RJ)

(72) Inventor(es): Sonia Soares Costa; Vera Lúcia Gonçalves Koatz; Bárbara Rossi Bergman

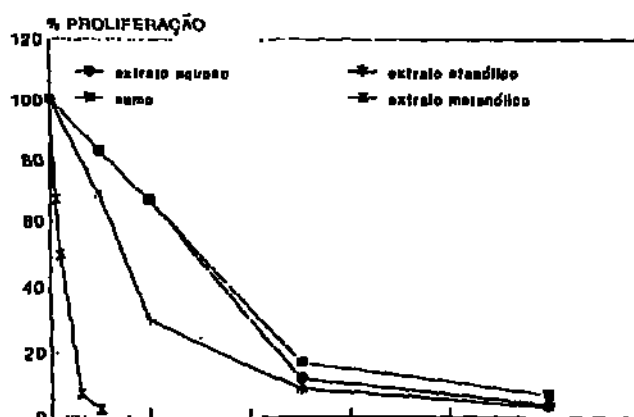
(74) Procurador: Nilza Xavier Kover

(57) Resumo: Esta invenção trata de processo de obtenção de sumos e extratos aquosos e alcoólicos de folhas, galhos e folhas, secos ou frescos das espécies de *Kalanchoe pinnata* e *Kalanchoe brasiliensis*, colhidos no Estado do Rio de Janeiro em diferentes épocas do ano. A partir do material vegetal fresco foram preparados: 1) sumos após processamento em triturador e filtração em papel; 2) extrato aquoso a frio ou a quente a 20% (p/v); 3) extratos etanólico e metanólico por maceração durante 3 dias ao abrigo da luz. A partir do material vegetal seco foram preparados: 1) extrato aquoso a quente a 10% (p/v); 2) extratos etanólico e metanólico por maceração a 10%. Os sumos e extratos assim obtidos inibiram a resposta proliferativa de linfócitos humanos e de camundongos in vitro. O extrato aquoso a quente produziu imunossupressão em camundongos, reduzindo respostas humorais e celulares inespecíficas ou específicas. Das vias de administração testadas, isto é, oral, intraperitoneal, tópica ou endovenosa, todas foram, em graus variados, eficazes em produzir imunossupressão. O mesmo extrato, administrado pela via intraperitoneal ou oral, produziu cura em animais infectados com *Leishmania m. amazonensis*.

A) EXTRATO AQUOSO



B) *K. pinnata*



TÍTULO: "PROCESSO DE OBTENÇÃO DE SUMOS E EXTRATOS DE ESPÉCIES DE Kalanchoe; APLICAÇÃO DO SUMO, EXTRATOS E SEUS COMPONENTES PARA IMUNOSSUPRESSÃO E PARA O TRATAMENTO DA LEISHMANIOSE."

5 Esta invenção trata de processos de obtenção de sumos e extratos das plantas do gênero Kalanchoe (sinonímia Bryophyllum), mais especificamente as espécies K. pinnata e K. brasiliensis capazes de inibir a proliferação de linfócitos humanos e de camundongos
10 estimulados por mitógenos in vitro, para uso in vivo como imunossupressor de respostas antigênicas e alogênicas e como protetor contra a leishmaniose tegumentar causada pelo parasita Leishmania amazonensis.

15 A leishmaniose tegumentar é uma doença endêmica em várias regiões do Brasil e de outros países de clima tropical e semi-tropical. O seu tratamento no Brasil ainda se baseia no emprego de antimoniais pentavalentes como o glucantime ou pentamidine, em séries de injeções intramusculares dolorosas e relativamente tóxicas. Muitas
20 vezes o tratamento é ineficaz, tendo este que ser mudado para anfotericina B, que normalmente requer internação do paciente por sua alta toxicidade. Métodos que induzem imunossupressão em camundongos, como irradiação gama, e

administração de drogas imunossupressoras, como a ciclofosfamida e a ciclosporina B são capazes de proteger camundongos contra a evolução da doença.

As espécies Kalanchoe brasiliensis e Kalanchoe pinnata, conhecidas no Brasil como saião, folha-da-fortuna, ou coirama, entre outras denominações, são usadas popularmente na forma de suco, infusões, decoctos ou mesmo em aplicação tópica direta para o tratamento de feridas cutâneas, artrites, úlceras gástricas, tosse, gânglios infartados ou até mesmo como profilático para picadas de cobras. Pouco se sabe, entretanto, sobre as propriedades químicas e farmacológicas de uma destas espécies, K. brasiliensis, a única autóctone. A literatura mostra que a espécie K. pinnata tem sido largamente estudada, tendo, inclusive, um dos seus componentes químicos sido patenteado como agente antialérgico (Int. Cl. 61-118319). Até o momento, porém, não há indicação do uso de extratos ou de seus componentes como imunomoduladores ou antiparasitários.

Neste estudo foram preparados sumos e extratos numa abordagem semelhante àquela utilizada pela população, contrariamente aos métodos convencionais empregados normalmente no preparo de extratos de plantas medicinais para estudo fitoquímico que fazem uso de solventes orgânicos tais como éter de petróleo, clorofórmio, etc.

O nosso estudo mostra que é possível se obter um material com atividade imunomoduladora em apenas duas

etapas, como no caso do sumo, empregando-se equipamentos industriais não sofisticados como triturador munido de prensa e um liofilizador. Esta invenção mostra-se, portanto, de interesse imediato para o setor farmacêutico.

5 O processo de obtenção do sumo é rápido e de alto rendimento, o que é atrativo do ponto de vista econômico.

A nossa invenção mostra também que os extratos alcoólicos das plantas frescas ou secas fornecem material com a mesma atividade imunomoduladora que o sumo, funcionando como uma opção de processamento, cuja vantagem é o uso de um macerador e de uma aparelhagem de evaporação sob pressão reduzida.

10 No Brasil, a maioria de população não tem condições econômicas para aquisição de fármacos industrializados, na grande maioria de origem sintética ou semi-sintética. Os resultados obtidos neste estudo permitem propor o uso das duas espécies de Kalanchoe como matéria prima para a elaboração de medicação imunomoduladora e anti-parasitária, apresentando a seu favor as vantagens abaixo:

a) plantas de uso difundido na população para combate das moléstias infecciosas em geral, não tóxicas.

b) plantas de cultivo fácil e perenes.

25 c) processo de extração de fácil aplicação industrial.

d) processo de extração econômico, com alta

viabilidade de transferência de tecnologia para obtenção de medicamento barato para a população.

e) é possível aproveitar de maneira racional e objetiva a enorme riqueza da flora medicinal brasileira, visando como beneficiário final a população do país.

Foram estudados os seguintes tipos de sumos e extratos:

- sumos de folhas frescas de K. pinnata.
- sumos de galhos frescos de K. pinnata.
- extrato aquoso de folhas frescas de K. pinnata e K. brasiliensis a frio e a quente.
- extrato aquoso de folhas secas de K. pinnata a quente.
- extrato etanólico de folhas frescas de K. pinnata.
- extrato etanólico de folhas secas de K. pinnata.
- extrato etanólico de galhos secos de K. brasiliensis.
- extrato metanólico de galhos secos de K. brasiliensis.

Para o preparo dos SUMOS, 20 g. de folhas frescas, ou galhos de Kalanchoe pinnata são lavados em água destilada e secas ao ar durante a noite. O material é então espremido em um triturador com prensa. O sumo de cor esverdeada assim obtido é em seguida filtrado em papel de filtro Whatman número 1, fornecendo um filtrado de cor amarelo-claro. O filtrado é congelado, liofilizado e o

material seco é guardado em frasco tampado a temperatura ambiente.

Para o preparo dos EXTRATOS AQUOSOS, as folhas frescas com pecíolo de K. pinnata ou K. brasiliensis são lavadas e trituradas em liquidificador com água destilada a 20% (w/v). Para o preparo de extrato a frio, a pasta obtida é filtrada em papel Whatman número 1, o filtrado é liofilizado e assim mantido à temperatura ambiente até o uso. Para o preparo do extrato a quente, a pasta obtida é aquecida a 50-55°C por 30 minutos, e filtrada ainda quente em papel de filtro Whatman número 1. O material filtrado é então liofilizado e armazenado em temperatura ambiente.

Para o preparo de EXTRATOS ETANÓLICOS, os galhos ou folhas lavados de Kalanchoe pinnata são secos em estufa ventilada a 70°C por 3-5 dias e então moídos em moinho. O pó é misturado com etanol 95° em uma concentração de 10% (w/v). A mistura é deixada macerando à temperatura ambiente por 3 dias ao abrigo da luz. O extrato é decantado e filtrado em papel de filtro número 1 e concentrado em concentrador rotatório à baixa pressão. O material pastoso obtido é mantido à temperatura ambiente até o uso. Alternativamente, as folhas frescas e lavadas de Kalanchoe pinnata são picadas e deixadas macerando por 3 dias a temperatura ambiente e ao abrigo da luz em etanol 95°C a uma concentração de 20% (w/v). Após este período o extrato é decantado e filtrado através de papel de filtro número 1. O filtrado é concentrado em um concentrador

rotatório sob baixa pressão, obtendo-se um resíduo pastoso de cor verde-escura que é mantido à temperatura ambiente até o uso.

Para o preparo do EXTRATO METANÓLICO, 143 g de galhos lavados de Kalanchoe brasiliensis são secos em estufa ventilada a 70°C por 3-5 dias. Após este período, os galhos são moídos em moinho. O pó obtido é então macerado em 500 ml de metanol por 24 horas. A primeira porção do extrato é retirada, e nova quantidade de metanol é adicionada (300 ml). A operação é repetida a cada 24 horas durante uma semana. Os extratos são evaporados em conjunto fornecendo um material oleoso verde-escuro, que é mantido à temperatura ambiente até o uso.

Para o uso nos ensaios biológicos, os materiais acima descritos são diluídos em água destilada ou solução de cloreto de sódio 0,85% em água destilada, a 20 mg/ml e esterilizados por filtração em filtros estéreis de membrana de acetato de celulose porosidade 0,45 µm (Nalgene).

Exemplos:

Exemplo 1. Ação imunossupressora in vitro:

Os extratos aquosos a quente de K. pinnata e K. brasiliensis (a), o sumo de K. pinnata (b) e o extrato metanólico de K. pinnata (c) possuem forte ação supressora sobre linfócitos humanos. Quando os linfócitos humanos são preparados a partir de sangue humano normal e incubados na presença das concentrações indicadas do

extrato/sumo, ocorre 100% de supressão da resposta proliferativa à fitohemaglutinina com concentrações de 50 µg/ml (a), 50 µg/ml (b) e 5 µg/ml (c), conforme figura 1.

O extrato aquoso a quente de K. pinnata também possui ação supressora sobre a resposta mitogênica de linfócitos murinos. Quando linfócitos preparados do baço de camundongos BALB/c normais são cultivados com concanavalina A a 2 µg/ml na presença das concentrações indicadas do extrato, observa-se 100% de supressão a uma concentração de 416 µg/ml (figura 2).

Exemplo 2. Ação imunossupressora in vivo:

O extrato aquoso a quente de Kalanchoe pinnata provoca imunossupressão generalizada quando administrado a camundongos BALB/c em doses intraperitoneais totais variando de 1 a 8 mg. Conforme mostra a figura 3, as células esplênicas dos animais tratados chegam a ter uma resposta ao mitógeno Concanavalina A até 50% mais baixas que as células dos animais não tratados. O tratamento com este mesmo extrato também reduz significativamente a capacidade das células de animais sensibilizados à ovoalbumina de responder a estimulação antigênica in vitro. Conforme mostra a figura 4, a resposta proliferativa à ovoalbuminas chega a ser 58% mais baixa que a resposta dos animais não tratados com o extrato. A produção de anticorpos específicos nestes animais também mostrou-se significativamente reduzida (30%) após o tratamento com o extrato pela via intraperitoneal (figura

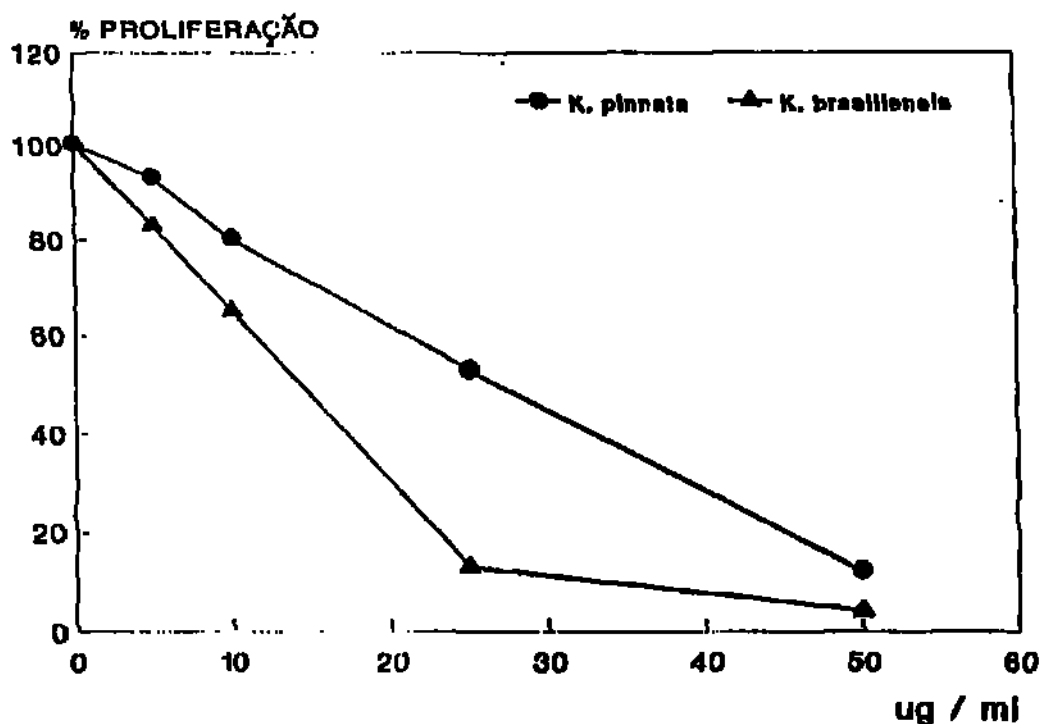
5). A administração do extrato por ~~outras vias que não a~~
intraperitoneal também mostra-se bastante eficaz em
produzir imunossupressão, conforme medida pela redução da
resposta de hipersensibilidade retardada à ovoalbumina em
5 relação aos animais somente imunizados (não tratados): 48%
oral, 73% intraperitoneal, 87% tópica e 98% endovenosa
(figura 6).

Exemplo 3. Ação terapêutica na leishmaniose:

Camundongos BALB/c infectados na pata com 2 x 10
10 promastigotas de Leishmania mexicana amazonensis mostraram
uma redução acentuada no crescimento da lesão tegumentar
após tratamento intraperitoneal com o extrato aquoso a
quente de Kalanchoe pinnata em 4 doses diárias de 4 mg
(figura 7). O tratamento prolongado com doses diárias de
15 8 mg pela via oral também mostrou-se bastante eficaz,
produzindo regressão total da lesão em 40 dias de
tratamento. Para efeito comparativo, o tratamento com
Glucantime, que é a droga de eleição para o tratamento da
leishmaniose na mesma dosagem produziu uma regressão mais
20 demorada da lesão (45 dias). Ao contrário do tratamento
com extrato de Kalanchoe em que os animais mantiveram-se
curados após 20 dias de suspensão do tratamento, no grupo
tratado com Glucantime, as lesões voltaram a crescer
gradativamente após o 15o. dia de suspensão do tratamento
25 (figura 8).

Figura 1: Efeito dos extratos de folhas de K. pinnata e K. brasiliensis na resposta proliferativa de linfócitos humanos. Células mononucleares humanas foram estimuladas a proliferar com 5 ug / ml de fitohemaglutinina. A por 72 horas na presença de : A) extratos aquosos de K. pinnata ou K. brasiliensis; ou B) outras preparações de K. pinnata, conforme indicado. 100 % de proliferação equivale a 12570 cpm. Valores representativos de 5 experimentos. Todos os erros padrões eram menores que 10% da média.

A) EXTRATO AQUOSO



B) K. pinnata

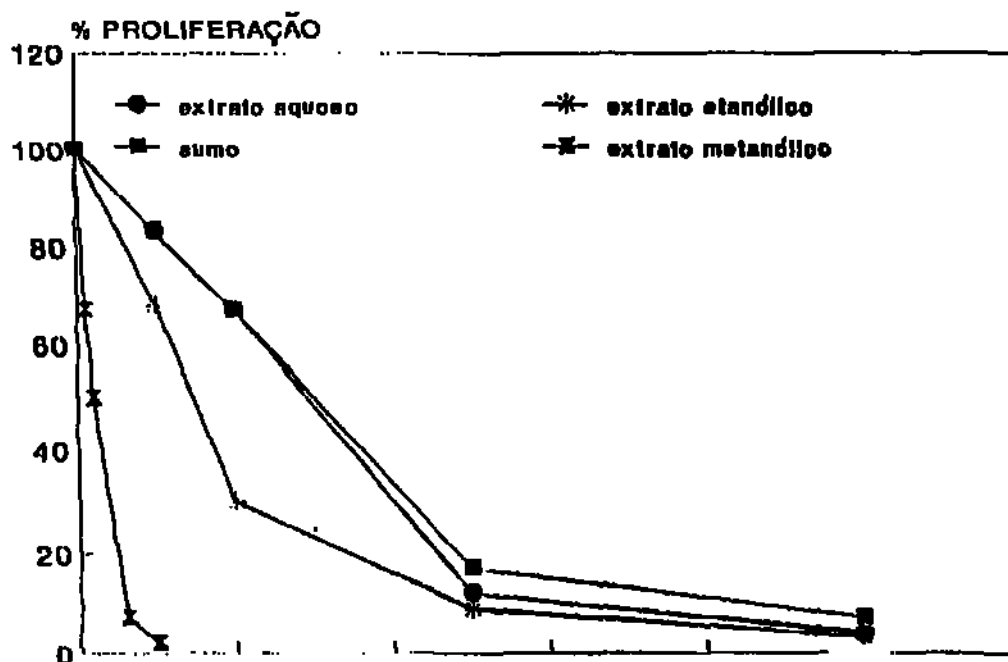


Figura. 2. Efeito supressor direto do extrato de *K. pinnata* sobre a resposta mitogênica de linfócitos T murinos. Células de camundongos normais foram induzidas a proliferar com 1 ug/ml de Concanavalina A por 36 horas na presença do extrato aquoso. A resposta proliferativa foi medida por incorporação de 3H-timidina nas últimas 6 horas. Significante em *p < 0.05, **p < 0.02 e ***p < 0.01 em relação às células sem extrato.

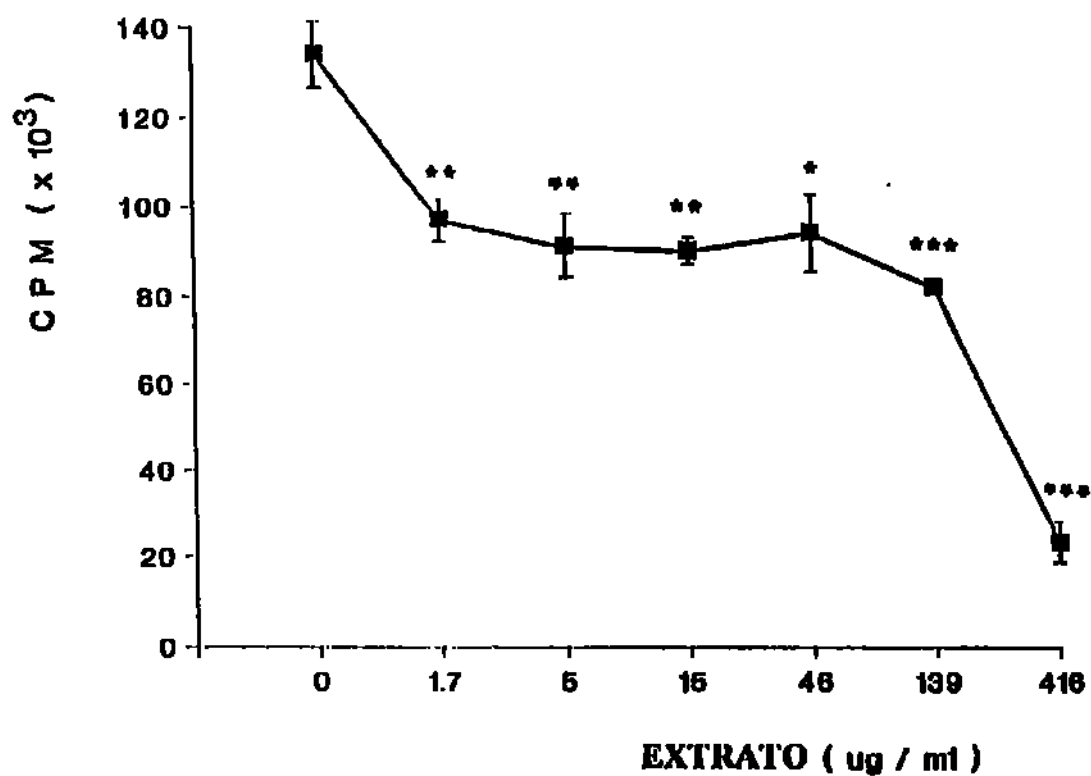


Figura 3. O tratamento de camundongos com extrato aquoso de *K. pinnata* suprime a resposta mitogênica de linfócitos T. Camundongos BALB/c (4 grupos) foram tratados pela via intraperitoneal com as seguintes doses do extrato: (●) 0.5 mg. (■) 2 mg. (▲) 8 mg. O tratamento foi repetido no dia seguinte. Os baços foram retirados no terceiro dia e as suas células estimuladas com Con A como descrito na Fig 2. Média e desvio padrão (n=3).

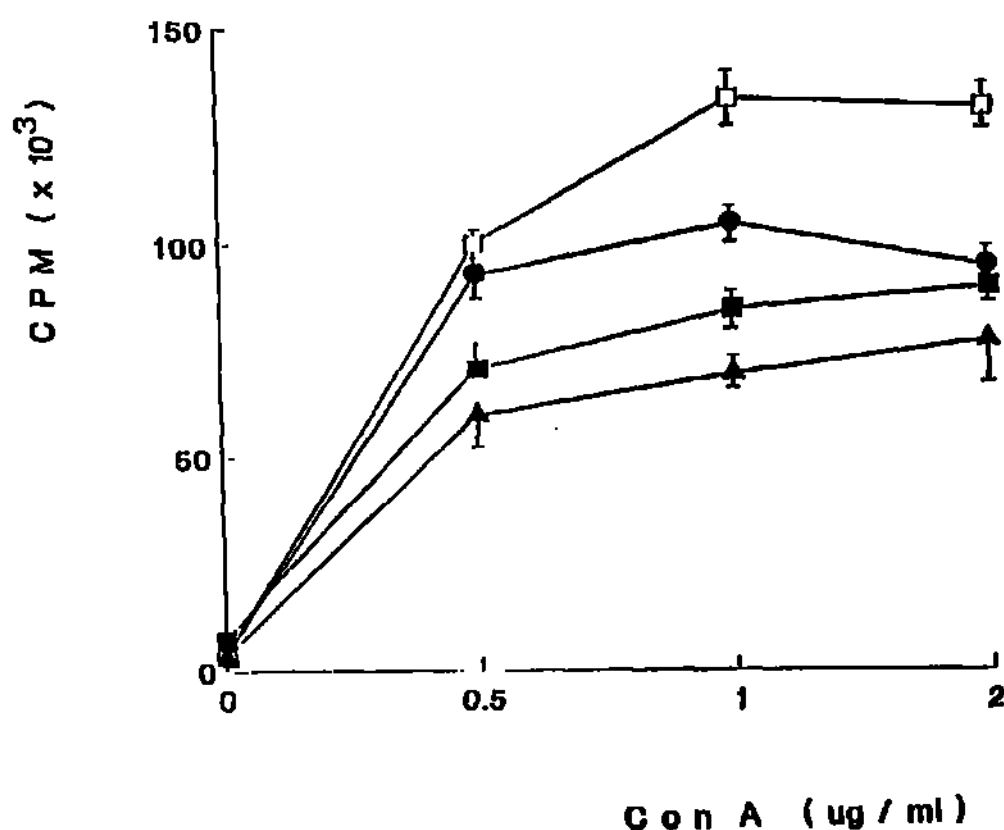


Figura 4. O tratamento de camundongos com extrato aquoso de *K. pinifolia* suprime a resposta proliferativa específica. Camundongos BALB/c (4 grupo) foram injetados pela via intraperitoneal com 200 ug de ovoalbumina (OVA) sozinha (■) ou junto com 4 mg do extrato (▲). Este procedimento foi repetido uma semana depois. Os baços foram retirados na semana seguinte e suas células foram induzidas a proliferar na presença de OVA por 72 horas. Níveis de significância (*) com. para a Fig. 2.

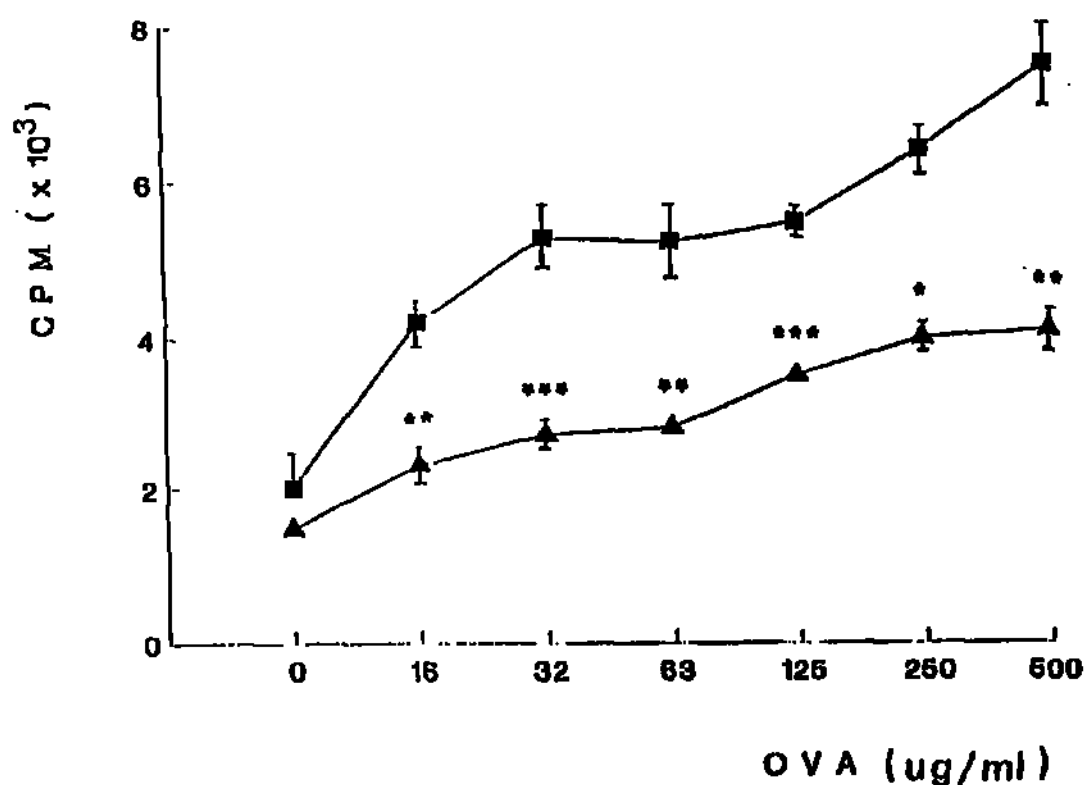


Figura 5. O tratamento de camundongos com extrato não-puro de *K. pinnata* suprime a produção de anticorpos específicos. Camundongos BALB/c (4º grupo) foram tratados com 4 mg de *K. pinnata* pela via intraperitoneal durante tres dias consecutivos (●). Um outro grupo recebeu salina somente (■). No quarto dia foram imunizados com 200 ug de OVA em Adjuvante Completo de Freund. Os animais foram sangrados no décimo dia e os soros agrupados para dosagem de IgG anti-OVA pelo método de ELISA. Os níveis de significância (*) são os mesmos descritos para a Fig. 2, sendo em relação ao soro não imune.

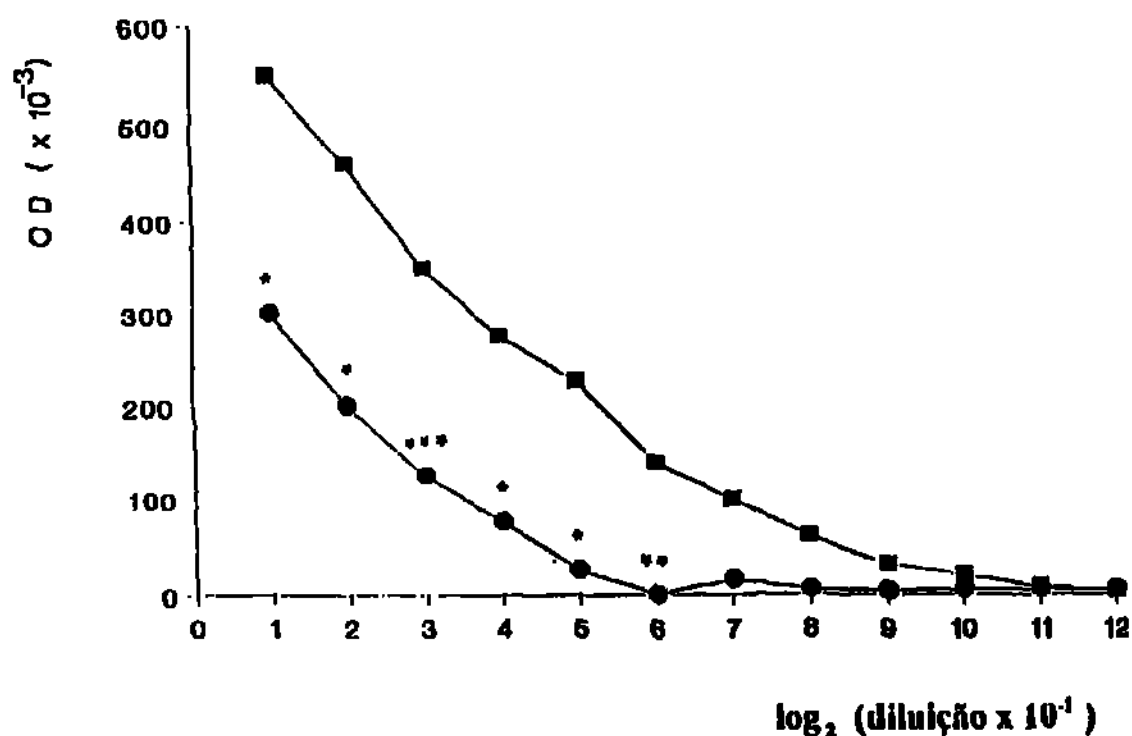


Figura 6. Efeito da via de administração do extrato de *K. pinifolia* na supressão da resposta de hipersensibilidade retardada. Camundongos receberam o extrato administrado por vias diferentes, a saber: endovenosa (1 mg), tópica (15 mg), intraperitoneal (2 mg) ou oral (1 mg). No dia seguinte foram imunizados com 200 ug de OVA pela via subcutânea, e no outro dia foram tratados novamente com o extrato pelas mesmas vias. Os animais controles foram somente imunizados. Onze dias mais tarde os animais receberam 200 ug de OVA no coxilha da pata trazeira e o inchaço produzido foi registrado 24 horas depois. Níveis de significância (*) como descrito para a Figura 2, em relação à pata contralateral que recebeu somente salina.

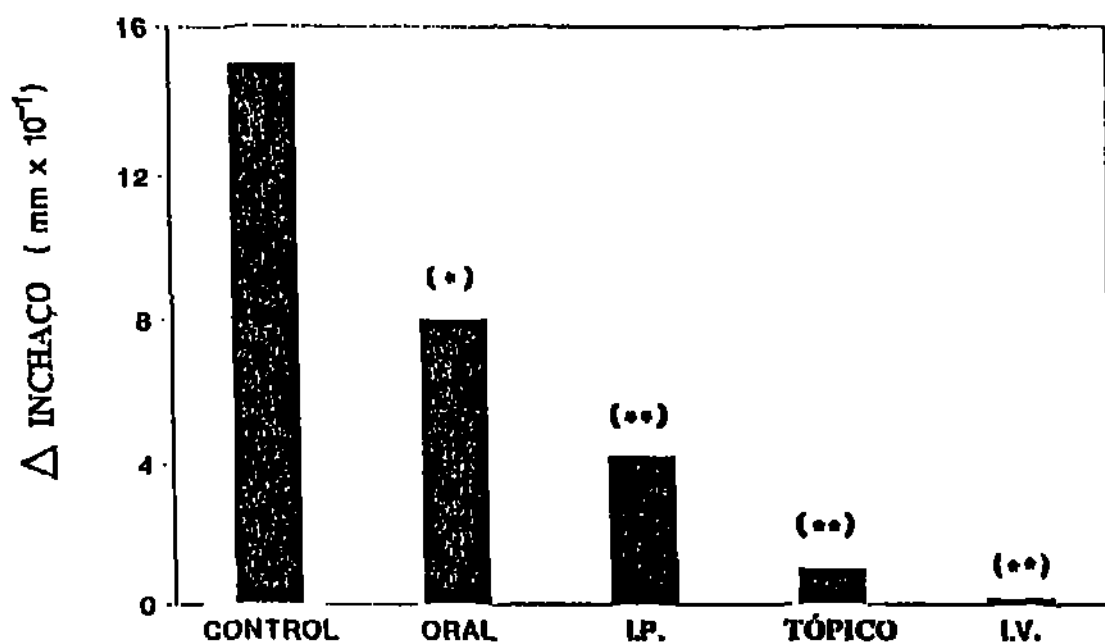


Figura 7. Ação terapêutica do extrato de *K. pinnata* na leishmaniose murina. Camundongos BALB/c (6 / grupo) foram tratados diariamente com 4 mg do extrato aquoso pela via intraperitoneal por 4 dias, e então infectados com *Leishmania m. amazonensis* na pata trazeira (tratamento profilático). Um outro grupo iniciou o tratamento após o dia 42 de infecção (tratamento terapêutico). O terceiro grupo foi somente infectado, e não recebeu nenhum tratamento com o extrato (controle). O crescimento da lesão foi registrado periodicamente, mostrando que nestas condições o extrato não possui efeito profilático, mas o tratamento terapêutico mostrou-se eficaz em controlar a infecção.

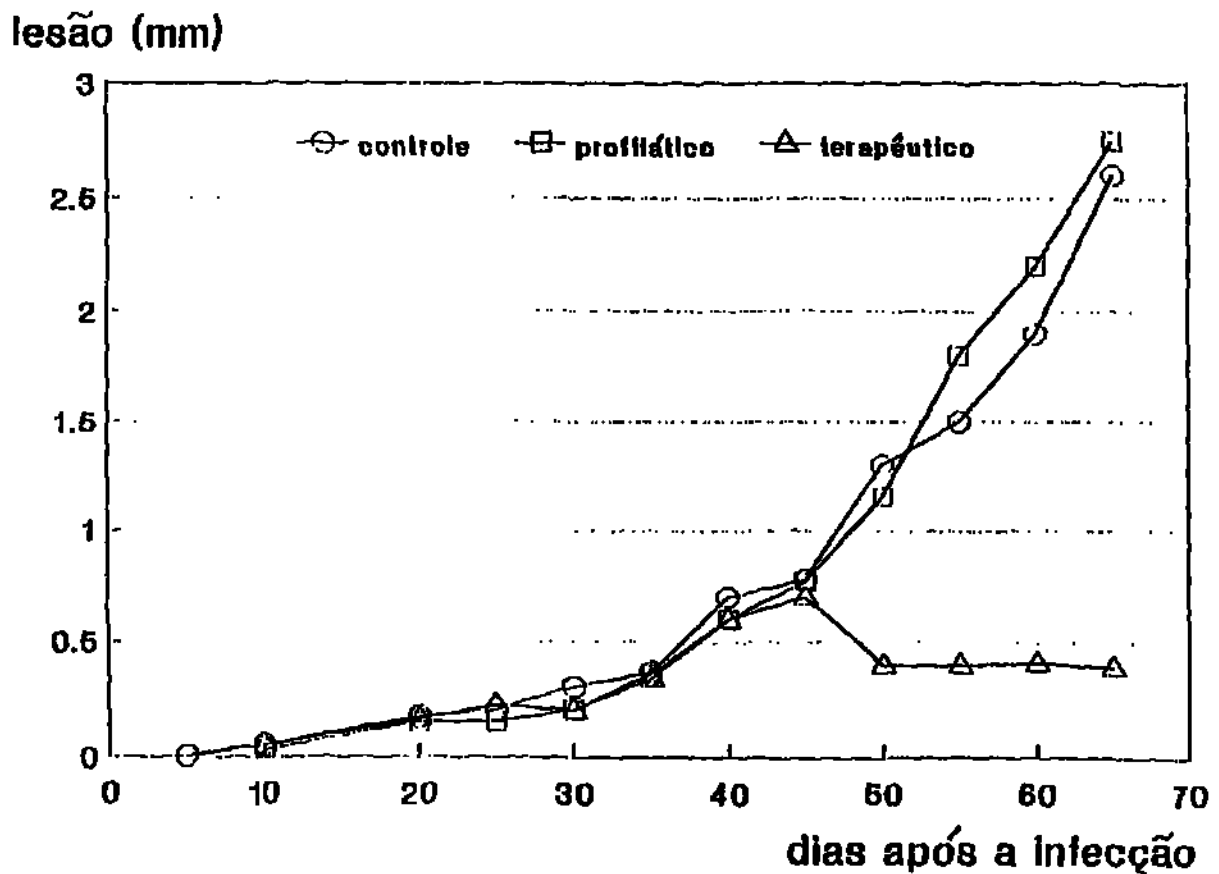
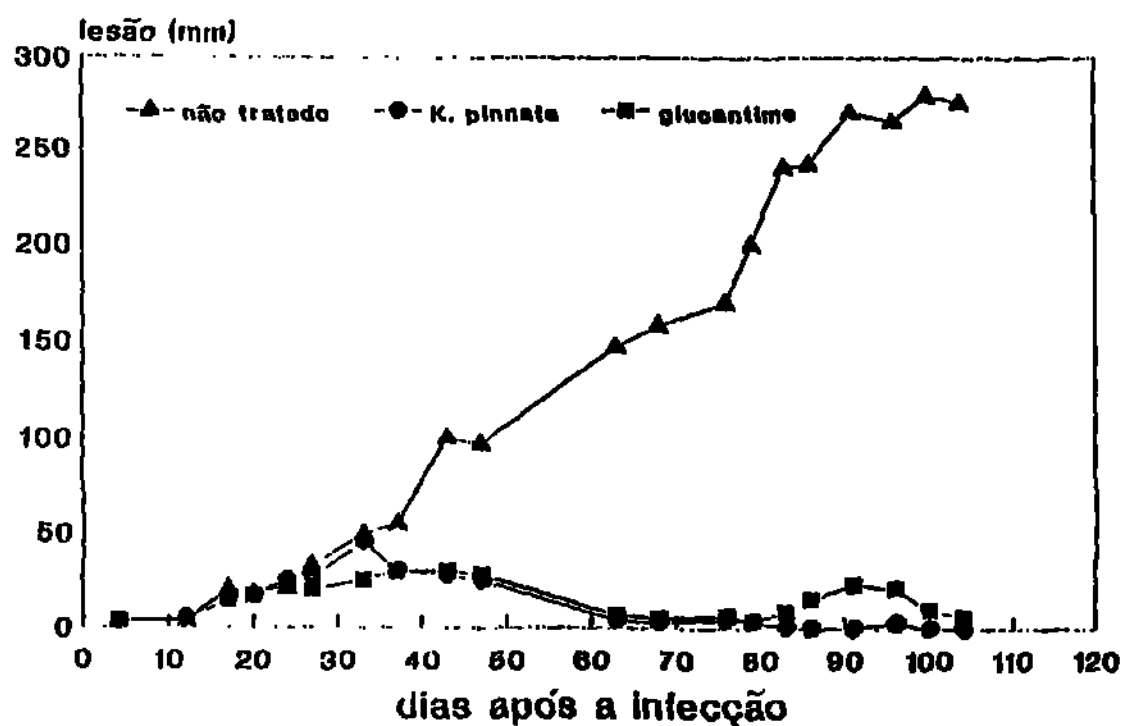


Figura 8. Eficácia do tratamento pela via oral com o extrato de *K. pinnata* na leishmaniose tegumentar experimental. Três grupos de camundongos BALB/c (6 / grupo) foram infectados na pata com promastigotas de *Leishmania m. amazonensis*. Após o sétimo dia de infecção, um grupo recebeu tratamento diário com 8 mg do extrato pela via oral administrado com sonda intragástrica por um período de 35 dias (●). Um outro grupo recebeu injeções intraperitoneais diárias de 4 mg de Glucantime no mesmo período (■). O terceiro grupo não recebeu nenhum tratamento (▲).



1. Processo de obtenção de sumo e extratos de espécies de planta do gênero Kalanchoe e seus componentes caracterizado pelo fato de ser constituído das seguintes etapas:

- 5 a) Para o preparo dos SUMOS, 20g de folhas frescas, ou galhos de Kalanchoe pinnata são lavados em água destilada e secos ao ar durante a noite. O material é então espremido em um triturador com prensa. O sumo de cor esverdeada assim obtido é em seguida
 - 10 filtrado em papel de filtro Whatman número 1, fornecendo um filtrado de cor amarelo-claro, caracterizado por ser constituído de 94% de água, 5, 2% de substâncias orgânicas e 0,72% resíduo mineral. O filtro é congelado, liofilizado e o material seco
 - 15 é guardado em frasco tampado à temperatura ambiente.
 - b) Para o preparo dos EXTRATOS AQUOSOS, as folhas frescas com pecíolo de K. pinnata ou K. brasiliensis são lavadas e trituradas em liquidificador com água destilada a 20% (w/v). Para o preparo de extrato a - 20 frio, a pasta obtida é filtrada em papel de filtro Whatman número 1, o filtrado é liofilizado e assim mantido à temperatura ambiente até o uso. Para o preparo do extrato a quente, a pasta obtida é aquecida a 50-55°C por 30 minutos, e filtrada ainda
 - 25 quente em papel de filtro Whatman número 1. O

material filtrado é então ~~filtrado~~ e armazenado em temperatura ambiente.

c) Para o preparo de EXTRATOS ETANÓLICOS, os galhos ou folhas lavados de Kalanchoe pinnata são secos em estufa ventilada a 70°C por 3-5 dias e então moídos em moinho. O pó é misturado com etanol 95° em uma concentração de 10% (w/v). A mistura é deixada macerando à temperatura ambiente por 3 dias ao abrigo da luz. O extrato é decantado e filtrado em papel de filtro número 1 e concentrado em concentrador rotatório à baixa pressão. O material pastoso obtido é mantido à temperatura ambiente até o uso. Alternativamente, as folhas frescas e lavadas de Kalanchoe pinnata são picadas e deixadas macerando por 3 dias a temperatura ambiente e ao abrigo da luz em etanol 95°C a uma concentração de 20% (w/v). Após este período, o extrato é decantado e filtrado através de papel de filtro número 1. O filtrado é concentrado em um concentrador rotatório sob baixa pressão, obtendo-se um resíduo pastoso de cor verde-escura que é mantido à temperatura ambiente até o uso.

d) Para o preparo do EXTRATO METANÓLICO, 143 g de galhos lavados de Kalanchoe brasiliensis são secos em estufa ventilada a 70°C por 3-5 dias. Após este período, os galhos são moídos em moinho. O pó

obtido é então macerado em 500 ml de metanol por 24 horas. A primeira porção do extrato é retirada, e nova quantidade de metanol é adicionada (300 ml). A operação é repetida a cada 24 horas durante uma semana. Os extratos são evaporados em conjunto fornecendo um material oleoso verde-escuro, que é mantido à temperatura ambiente até o uso.

2. Um método para imunossupressão caracterizado pela administração de uma quantidade terapêuticamente eficaz do extrato ou sumo de Kalanchoe brasiliensis ou seus componentes em um veículo farmacêuticamente aceitável em um animal.

3. Um método da reivindicação 2 onde um componente do extrato ou sumo de Kalanchoe pinnata ou Kalanchoe brasiliensis é utilizado.

4. Um método para inibir síntese de imunoglobulina, síntese de DNA, resposta proliferativa de linfócitos periféricos de um animal caracterizado pelo tratamento com uma quantidade efetiva de extrato ou sumo de Kalanchoe ou um seu componente.

5. Um método para tratar uma doença parasitária caracterizado pela administração de uma quantidade terapêuticamente eficaz ou sumo de Kalanchoe pinnata ou Kalanchoe brasiliensis ou seus componentes em um veículo farmacêuticamente aceitável em um animal.

6. Um método da reivindicação 5 onde a doença

parasitária é a leishmaniose. P1 9400120

7. Um método da reivindicação 6 onde a leishmaniose é do tipo tegumentar ou visceral.

RESUMO

PI 94001200

Esta invenção trata de processo de obtenção de sumos e extratos aquosos e alcoólicos de folhas, galhos e folhas, secos ou frescos das espécies de Kalanchoe pinnata e Kalanchoe brasiliensis, colhidos no Estado do Rio de Janeiro em diferentes épocas do ano. A partir do material vegetal fresco foram preparados: 1) sumos após processamento em triturador e filtração em papel; 2) extrato aquoso a frio ou a quente a 20% (p/v); 3) extratos etanólico e metanólico por maceração durante 3 dias ao abrigo da luz. A partir do material vegetal seco foram preparados: 1) extrato aquoso a quente a 10% (p/v); 2) extratos etanólico e metanólico por maceração a 10%. Os sumos e extratos assim obtidos inibiram a resposta proliferativa de linfócitos humanos e de camundongos in vitro. O extrato aquoso a quente produziu imunossupressão em camundongos, reduzindo respostas humorais e celulares inespecíficas ou específicas. Das vias de administração testadas, isto é, oral, intraperitoneal, tópica ou endovenosa, todas foram, em graus variados, eficazes em produzir imunossupressão. O mesmo extrato, administrado pela via intraperitoneal ou oral, produziu cura em animais infectados com Leishmania m. amazonensis.